

Ensayo Progensa PCA3

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Para exportación de EE. UU. únicamente.

Información general	2
Uso indicado	2
Resumen y explicación de la prueba	2
Principios del procedimiento	2
Reactivos y materiales suministrados	4
Materiales	8
Advertencias y precauciones	10
Requisitos de almacenamiento y manipulación	13
Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes	15
Procedimiento de la prueba	17
Notas sobre el procedimiento	23
Procedimientos de control de calidad	27
Interpretación de los resultados	28
Limitaciones	33
Características de rendimiento	34
Bibliografía	40

Información general

Uso indicado

El ensayo Progensa PCA3 es una prueba de amplificación de ácido nucleico (NAAT) *in vitro* que detecta el ácido ribonucleico (ARN) del gen 3 del cáncer de próstata (PCA3) en los especímenes de orina de varón para generar un PCA3 Score. El PCA3 Score está destinado a usarse en conjunción con los algoritmos de diagnóstico conformes con las normas de atención de la salud como ayuda en el diagnóstico del cáncer de próstata.

Resumen y explicación de la prueba

El uso de la prueba del suero antígeno prostático específico (PSA) para la evaluación del cáncer de próstata permite la biopsia de tumores más pequeños anteriormente no detectados (1), creando así un nuevo dilema de diagnóstico: solo una fracción de hombres con niveles de suero PSA elevados tienen cáncer de próstata detectable. Los hombres con por lo menos una biopsia negativa a menudo tienen un suero PSA persistentemente elevado, principalmente debido a una hipertrofia de la próstata y a hiperplasias prostáticas benignas (BPH). No obstante, una importante proporción de hombres con un leve aumento de suero PSA (2,5-4,0 µg/L) tienen, o desarrollarán, cáncer de próstata clínicamente significativo (1). Aunque la biopsia sigue siendo el patrón de referencia para la detección del cáncer de próstata, se necesitan pruebas más precisas con una mayor especificidad antes de tomar la decisión de proceder con una biopsia de próstata.

El PCA3 (también conocido como «PCA3^{DD3}» o «DD3^{PCA3}») es un ARN no codificante específico de la próstata sobre expresado significativamente en las células del cáncer de próstata, con una media 66 veces más elevada que los tejidos benignos adyacentes (2). En contraste, la expresión del gen PSA es similar en células de próstata cancerosas y benignas; los niveles de ARN de PSA pueden así utilizarse para normalizar la cantidad del ácido ribonucleico (ARN) específico de la próstata en muestras de prueba molecular. Se ha demostrado la viabilidad de las pruebas moleculares cuantitativas con base PCA3 de los sedimentos urinarios (2) y de orina entera (3).

El ensayo Progensa PCA3 utiliza la orina entera recolectada después del examen digital rectal (DRE) consistente en tres presiones por lóbulo. El DRE libera las células de la próstata a través del sistema de conductos de la próstata al tracto urinario, donde se recolectan con el primer chorro de orina. La orina se procesa con el añadido del Medio de transporte de orina (UTM) que disuelve las células y estabiliza el ARN. Los ARN de PCA3 y PSA se cuantifican y el PCA3 Score se determina según la proporción de ARN de PCA3/PSA. Además de normalizar la señal PCA3, la medición del ARN de PSA sirve también para confirmar que la liberación de ARN específico de la próstata es suficiente para generar un resultado válido. Los PCA3 Score más altos se correlacionan con una probabilidad más alta de una biopsia de próstata positiva.

Principios del procedimiento

El ensayo Progensa PCA3 se compone de dos pruebas cuantitativas de amplificación del ácido nucleico. El ensayo Progensa PCA3 combina las tecnologías de captura seleccionada, amplificación mediada por transcripción (TMA) y ensayo de protección de la hibridización (HPA) para simplificar el procesamiento de los especímenes de orina, amplificar el ARN diana y detectar amplicón, respectivamente.

Cuando se realiza el ensayo Progensa PCA3 en el laboratorio, las moléculas del ARN diana se aíslan de los especímenes de orina por medio de la captura seleccionada. Los oligonucleótidos («oligonucleótidos de captura») complementarios de las regiones específicas de la secuencia de las dianas están hibridizados a las dianas en el espécimen urinario. Se utiliza un oligonucleótido de captura distinto para cada diana. La diana hibridada se captura en micropartículas magnéticas que se separan del espécimen urinario en un campo magnético. Las etapas de lavado se utilizan para eliminar los componentes exógenos del tubo de reacción. La separación magnética y las etapas de lavado se realizan con un sistema de captura seleccionada.

La amplificación de las dianas se produce por medio de la TMA, que es el método de amplificación del ácido nucleico basado en la transcripción que utiliza dos enzimas: la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y la polimerasa ARN T7. Se utiliza un solo juego de cebadores para cada diana. La transcriptasa inversa se usa para generar una copia de ácido desoxiribonucleico (ADN) (que contiene una secuencia promotora de la polimerasa ARN T7) de la secuencia diana. La ARN polimerasa T7 genera varias copias del amplicón de ARN a partir del molde de copia de ADN.

La detección se logra por medio del ensayo de protección de la hibridación (HPA) con sondas de ácido nucleico de cadena única y quimioluminiscentes que son complementarias del amplicón. Se utilizan sondas distintas para cada amplicón diana. Las sondas de ácido nucleico marcadas se hibridan específicamente con el amplicón. El reactivo de selección diferencia las sondas hibridadas de las no hibridadas, inactivando el marcador de las sondas no hibridadas. Durante la detección, la señal quimioluminiscente producida por la sonda hibridada se mide en un luminómetro y su valor se comunica como unidades relativas de luz (RLU).

Los ARN de PCA3 y PSA se cuantifican en tubos separados y se determina el PCA3 Score. Los calibradores que contienen cantidades conocidas del transcripto ARN de PCA3 y PSA se incluyen en cada ciclo del ensayo y se usan para generar una curva estándar. También se incluyen los controles PCA3 y PSA para verificar la precisión de los resultados interpolados a partir de la curva estándar.

Reactivos y materiales suministrados

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

A continuación se listan los reactivos y materiales provistos en el kit del ensayo Progensa PCA3/PSA para el ensayo Progensa PCA3. Junto al nombre del reactivo se muestran también los símbolos de identificación del reactivo.

Kit del ensayo Progensa PCA3, 2 x 100 reacciones, REF. 302355 (8 cajas)

Kit de 100 reacciones Progensa PCA3

Caja refrigerada Progensa PCA3 - Almacenar entre 2 °C y 8 °C tras recibirla hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación PCA3 <i>Ácidos nucleicos no infecciosos desecados en solución tamponada de HEPES con un contenido de <10 % de agente de volumen.</i>	1 vial
E	Reactivo enzimático PCA3/PSA <i>Transcriptasa inversa y ARN polimerasa secados en solución tamponada de HEPES con un contenido de <10 % de agente de volumen.</i>	1 vial
P	Reactivo de sonda PCA3 <i>Sondas ADN quimiluminiscentes no infecciosas secadas en solución tamponada de succinato con un contenido de <5 % de agente de volumen y <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 vial

Caja a temperatura ambiente Progensa PCA3 - Almacenar entre 15 °C y 30 °C tras recibirla hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
AR	Solución de reconstitución de amplificación PCA3 <i>Solución acuosa con contenido de conservantes (<1 % parabens).</i>	1 x 9,3 mL
ER	Solución de reconstitución enzimática PCA3/PSA <i>Solución tamponada HEPES con surfactante (10 % Triton X-100) y 20 % glicerol.</i>	1 x 3,3 mL
PR	Solución de reconstitución de sonda PCA3/PSA <i>Solución tamponada de succinato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 x 12,4 mL
S	Reactivo de selección PCA3/PSA <i>Solución tamponada de borato con surfactante (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 mL
TCR	Reactivo de captura seleccionada PCA3 <i>Ácido nucleico no infeccioso en solución tamponada de HEPES con una fase sólida.</i>	1 x 22 mL
	Tarjetas de sellado	1 paquete
	Collares de reconstitución	1 paquete

Kit de calibradores y controles Progensa PCA3 - Almacenar entre 2 °C y 8 °C tras recibirlo hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
CAL	Calibrador 1 PCA3 <i>Solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 x 2,0 mL
CAL	Calibradores 2-5 PCA3 <i>Ácido nucleico PCA3 no infeccioso en solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	4 x 1,7 mL
PC	Controles positivos PCA3 <i>Ácido nucleico PCA3 no infeccioso en solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	2 x 1,7 mL
	Hoja de información de concentraciones PCA3	1 hoja

Kit de 100 reacciones Progensa PSA

Caja refrigerada Progensa PSA - Almacenar entre 2 °C y 8 °C tras recibirla hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación PSA <i>Ácidos nucleicos no infecciosos desecados en solución tamponada de HEPES con un contenido de <10 % de agente de volumen.</i>	1 vial
E	Reactivo enzimático PCA3/PSA <i>Transcriptasa inversa y ARN polimerasa secados en solución tamponada de HEPES con un contenido de <10 % de agente de volumen.</i>	1 vial
P	Reactivo de sonda PSA <i>Sondas ADN quimiluminiscentes no infecciosas secadas en solución tamponada de succinato con un contenido de <5 % de agente de volumen y <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 vial

Caja a temperatura ambiente Progensa PSA - Almacenar entre 15 °C y 30 °C tras recibirla hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
AR	Solución de reconstitución de amplificación PSA <i>Solución acuosa con contenido de conservantes (<1 % parabens).</i>	1 x 9,3 mL
ER	Solución de reconstitución enzimática PCA3/PSA <i>Solución tamponada HEPES con surfactante (10 % Triton X-100) y 20 % glicerol.</i>	1 x 3,3 mL
PR	Solución de reconstitución de sonda PCA3/PSA <i>Solución tamponada de succinato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 x 12,4 mL
S	Reactivo de selección PCA3/PSA <i>Solución tamponada de borato con surfactante (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 mL
TCR	Reactivo de captura seleccionada PSA <i>Ácido nucleico no infeccioso en solución tamponada de HEPES con una fase sólida.</i>	1 x 22 mL
	Tarjetas de sellado	1 paquete
	Collares de reconstitución	1 paquete

Kit de calibradores y controles Progensa PSA - Almacenar entre 2 °C y 8 °C tras recibirlo hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
CAL	Calibrador 1 PSA <i>Solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	1 x 2,0 mL
CAL	Calibradores 2-5 PSA <i>Ácido nucleico PSA no infeccioso en solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	4 x 1,7 mL
PC	Controles positivos PSA <i>Ácido nucleico PSA no infeccioso en solución tamponada de fosfato con un contenido de <5 % de laurilsulfato de litio.</i>	2 x 1,7 mL
	Hoja de información de concentraciones PSA	1 hoja

Fluidos para ensayos Aptima - Almacenar entre 15 °C y 30 °C (2 cajas) tras recibirlos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta

Símbolo	Componente	Cantidad
W	Solución de lavado <i>Solución tamponada de HEPES con un contenido de <2 % de dodecilsulfato sódico.</i>	1 x 402 mL
DF	Tampón para fluido de desactivación <i>Solución tamponada de bicarbonato.</i>	1 x 402 mL
O	Reactivo de aceite <i>Aceite de siliconas.</i>	1 x 24,6 mL

Nota: Todos los materiales incluidos en el kit de ensayo Progensa PCA3 también se pueden comprar por separado (consulte la Materiales sección para obtener más detalles).

Materiales

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Nota: Los materiales distribuidos por Hologic figuran con el número de catálogo.

Materiales necesarios pero no suministrados

	<u>REF.</u>
Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit	302352
Luminómetro Leader HC+	104747
Sistema de captura seleccionada (TCS) Hologic	104555
Kit de reactivos Auto Detect Aptima	301048
2 pipetas de repetición eppendorf Repeater Plus	105725
Puntas para pipeta de repetición (2,5 mL, 5,0 mL, 25,0 mL)	—
Lo siguiente:	—
2 mezcladores vorticiales multitubos	102160F
3 circuladores para baños de agua	104586F
(62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	
3 espaciadores para baños de agua	104627
O	
2 baños de calor seco/agitadores vorticiales SB100	105524F
Dependiendo de la producción pueden ser necesarios	
instrumentos SB100 adicionales throughput	
Micropipeta de 1.000 µL RAININ PR1000	901715
Puntas de 1.000 µL P1000	105049
Pipeta, eppendorf 20 a 200 µL	105726
Puntas, pipeta 20 a 200 µL	—
Lejía, solución de hipoclorito de sodio del 5 % al 7 % (de 0,7 M a 1,0 M)	—
Recipiente de plástico grande con tapa	—
Recipientes estándar para la recolección de orina, sin conservantes	—
Unidades de diez tubos (TTU)	TU0022
Casetes de diez puntas (TTC)	104578
Patrón de calibración SysCheck	301078

Materiales opcionales

	<u>REF.</u>
Kit de 100 reacciones Progensa PCA3	302354
Kit de 100 reacciones Progensa PSA	302357
Kit de calibradores y controles Progensa PCA3	302353

	<u>REF.</u>
Kit de calibradores y controles Progensa PSA	302356
Pruebas múltiples de cualificación Progensa PCA3/PSA	302350
Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit	302351
Kit de fluidos del ensayo Aptima	302002C
Puntas de pipetas desechables con filtro (1 mL)	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4	900932
<i>Conjunto de placa de plataforma PCA3, DTS 800</i>	902021 —
<i>Recipiente de reactivos (cuarto de módulo de 40 mL)</i>	104765
<i>Recipiente de reactivos dividido (cuarto de módulo de 19 mL x 2)</i>	901172
Tubos de transporte	302521
Tapones perforables de repuesto	302520
Tapones no perforables de repuesto	103036A

Advertencias y precauciones

- A. Para uso diagnóstico *in vitro*.
- B. Para exportación de EE. UU. únicamente.

Relacionadas con el laboratorio

- C. Utilice únicamente el material desechable de laboratorio suministrado o especificado.
- D. Siga las precauciones de rutina del laboratorio. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Utilice guantes desechables sin talco, protección ocular y bata de laboratorio cuando manipule los especímenes de orina y los reactivos del kit. Lávese bien las manos después de manipular los especímenes de orina y los reactivos del kit.
- E. **Advertencia: Irritantes, corrosivos.** Evite el contacto de los reactivos Auto Detect 1 y Auto Detect 2 con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si estos fluidos entran en contacto con la piel o los ojos, lave la zona afectada con agua. Si se produce un vertido de estos fluidos, diluya el vertido con agua antes de secarlo.
- F. Las superficies de trabajo, las pipetas y otros equipos se deben descontaminar periódicamente con solución de hipoclorito de sodio del 2,5 % al 3,5 % (0,35 M a 0,5 M) (consulte *Notas sobre el procedimiento*).
- G. Para reducir al mínimo la contaminación por amplicones en el ensayo se recomienda encarecidamente utilizar un área aparte para realizar la postamplificación. Este área dedicada debe estar alejada del área de preamplificación, donde se realiza la preparación del reactivo, la captura seleccionada y la amplificación.
- H. Para evitar que las áreas del laboratorio se contaminen con amplicones, dichas áreas deben estar diseñadas para que el flujo de trabajo sea unidireccional, desde la preparación del reactivo hasta la postamplificación. Las muestras, el equipo y los reactivos no deben devolverse a una zona donde se realizó un paso anterior. El personal no debe volver a las áreas de trabajo anteriores sin tomar las medidas de prevención contra la contaminación adecuadas.

Relacionadas con las muestras

- I. Después de añadir la orina, el nivel de líquido en el tubo de transporte del espécimen de orina debe estar inicialmente entre las dos líneas indicadoras negras de la etiqueta del tubo. De lo contrario, el espécimen debe rechazarse.
- J. Mantenga las condiciones de almacenamiento apropiadas durante el envío de especímenes para garantizar la integridad de los mismos. No se ha evaluado la estabilidad de los especímenes en condiciones de envío distintas a las recomendadas.
- K. Las fechas de caducidad que figuran en los kits de recolección son válidas para los sitios de recolección y no para el centro de análisis. Las muestras recolectadas antes de la fecha de caducidad del kit de recolección y transportadas y almacenadas de acuerdo con el prospecto, son válidas para los análisis aunque la fecha de caducidad del tubo de recolección haya caducado.
- L. Almacene todos los especímenes a la temperatura especificada. El uso de especímenes no almacenados correctamente puede afectar a los resultados del ensayo. Consulte

Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes para obtener instrucciones específicas.

- M. Las muestras pueden ser infecciosas. Siga las precauciones universales para realizar este ensayo. El director del laboratorio debe establecer los métodos de manipulación y eliminación adecuados. Estos procedimientos solo los debe realizar personal debidamente cualificado en el uso del ensayo Progensa PCA3 y con la formación adecuada para manipular materiales infecciosos.
- N. Evite la contaminación cruzada durante los pasos de manipulación de las muestras. Los especímenes de orina pueden contener altos niveles de ARN diana. Compruebe que los recipientes de los especímenes no entren en contacto unos con otros y deseche los materiales usados sin pasarlos por encima de los recipientes abiertos. Se deben cambiar los guantes si entran en contacto con un espécimen para evitar la contaminación cruzada.

Relacionadas con el ensayo

- O. No utilice este kit después de su fecha de caducidad.
- P. **Para el kit del ensayo Progensa PCA3, no intercambie, mezcle ni combine reactivos del ensayo PCA3 con números de lotes diferentes** (esto es, para cada analito, los reactivos del ensayo en la caja «refrigerada» y en la caja «a temperatura ambiente» deben proceder del mismo lote). Los reactivos del ensayo pueden utilizarse con diferentes lotes de los kits de calibradores y controles. Los kits de fluidos del ensayo Aptima son intercambiables. Los kits de reactivos PCA3 y PSA no necesitan emparejarse uno con otro.
- Q. Almacene todos los reactivos del ensayo a la temperatura especificada. El uso de reactivos del ensayo no almacenados correctamente puede afectar a los resultados del ensayo. Consulte *Requisitos de almacenamiento y manipulación* and *Notas sobre el procedimiento* para obtener instrucciones específicas.
- R. Para la desactivación del ensayo (consulte *Procedimiento de la prueba*), la concentración mínima de solución de hipoclorito de sodio debe ser de 2,5 % (0,35 M) **después** de una dilución de 1:1 con el tampón de desactivación. Por lo tanto, la solución de hipoclorito de sodio inicial debe ser del 5 % al 7 % (0,7 M a 1,0 M) para obtener la concentración final necesaria para la desactivación.
- S. Se deben utilizar puntas con tapones hidrófobos. Se debe dedicar un mínimo de dos pipetadores automáticos para su uso en este ensayo: uno para los pasos de preamplificación y el otro para los pasos de postamplificación. Se debe dedicar un micropipetador al uso de la transferencia de especímenes, a menos que se use el instrumento TECAN Freedom EVO 100/4. Todas las pipetas se deben limpiar periódicamente tal como se describe en *Notas sobre el procedimiento*.
- T. Cuando se usen pipetadores automáticos para la adición de reactivos, no debe tocarse el tubo de reacción con la punta del pipetador para evitar la contaminación cruzada de un tubo a otro.
- U. Es necesaria una mezcla adecuada para lograr el resultado preciso del ensayo. Consulte *Notas sobre el procedimiento* para conocer los detalles completos.

- V. Se deben dedicar baños separados para los pasos de preamplificación, amplificación y postamplificación en el ensayo.
- W. Algunos reactivos de este kit están etiquetados con símbolos de riesgo y seguridad de acuerdo con la Directiva Europea 1999/45/EC y se deben manipular según la misma. Las Hojas de información de seguridad sobre materiales se encuentran en www.hologic.com y están disponibles bajo pedido.

Requisitos de almacenamiento y manipulación

- A. Consulte Tabla 1 para obtener más información sobre el almacenamiento de los reactivos.

Tabla 1: Almacenamiento de reactivos

Reactivo/fluido	Almacenamiento sin abrir	Abierto/Estabilidad reconstituida (hasta la fecha de caducidad)
Reactivos de amplificación	De 2 °C a 8 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 2 °C a 8 °C*
Reactivos de sonda	De 2 °C a 8 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 2 °C a 8 °C*
Reactivo enzimático	De 2 °C a 8 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 2 °C a 8 °C*
Reactivos de captura seleccionada	De 15 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 15 °C a 30 °C
Solución de reconstitución de amplificación	De 2 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	N/C (uso único)
Solución de reconstitución de sonda	De 2 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	N/C (uso único)
Solución de reconstitución enzimática	De 2 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	N/C (uso único)
Reactivo de selección	De 2 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 15 °C a 30 °C
Calibradores	De 2 °C a 8 °C hasta la fecha de caducidad	N/C (ciclo único)
Controles	De 2 °C a 8 °C hasta la fecha de caducidad	N/C (ciclo único)
Reactivo de aceite	De 15 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 15 °C a 30 °C
Solución de lavado	De 15 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	30 días de 15 °C a 30 °C
Tampón para fluido de desactivación	De 15 °C a 30 °C hasta la fecha de caducidad	28 días de 15 °C a 30 °C

*Puede utilizarse nuevamente para otros ciclos del ensayo, hasta cuatro veces, siempre y cuando la cantidad de tiempo total a temperatura ambiente no exceda 24 horas.

- B. **No almacene el reactivo de captura seleccionada a temperaturas inferiores a los 15 °C.**
- C. Tanto el reactivo de sonda como el reactivo de sonda reconstituido son fotosensibles. Proteja estos reactivos de una exposición prolongada a la luz durante el almacenamiento y la preparación para su uso.
- D. **No congele los reactivos.**
- E. No use los reactivos o los fluidos después de la fecha de caducidad.
- F. Los calibradores y controles Progensa PCA3 y PSA son viales para un solo ciclo y se deben desechar después de su uso.
- G. Los cambios en la apariencia física del reactivo suministrado pueden indicar inestabilidad o deterioro de los materiales. Si se observan cambios en la apariencia física una vez que se han vuelto a suspender los reactivos (ej., cambios en el color o turbiedad del reactivo

indicativos de contaminación microbiana), póngase en contacto con el departamento de asistencia técnica de Hologic antes de usarlos.

- H. Deseche los reactivos reconstituidos después de 30 días o en la fecha de caducidad, lo que suceda primero.
- I. Los reactivos sobrantes abiertos o reconstituidos se pueden usar en ensayos subsiguientes si se han almacenado de forma apropiada después de su uso inicial. El reactivo sobrante se puede agrupar con un reactivo recién preparado o con otro sobrante del mismo lote. **No intercambie, mezcle ni combine reactivos de kits con números de lotes diferentes** (consulte *Advertencias y precauciones*). Ninguno de los componentes del reactivo agrupado puede exceder los límites de almacenamiento del reactivo abierto o reconstituido. Asegúrese de que el reactivo agrupado se ha mezclado bien y de que se ha preparado un volumen adecuado para suministrar la cantidad suficiente de reactivo para un ciclo completo del ensayo.

Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes

El ensayo Progensa PCA3 está diseñado para cuantificar el ARN de PCA3 y PSA del primer chorro de orina recolectada después del examen digital rectal (DRE) consistente en tres presiones por lóbulo. La orina se procesa con el Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit. La estabilidad del ARN de PCA3 y PSA en la orina y en la orina procesada se estableció realizando la monitorización de los niveles de copia del ARN en especímenes de orina recolectados según las instrucciones que figuran a continuación.

A. Instrucciones para la recolección y el procesamiento de especímenes de orina:

1. Se recomienda que el paciente beba una cantidad de agua abundante (aproximadamente 500 mL) para asegurarse de que la recolección de orina sea suficiente.
2. Se debe realizar un examen digital rectal (DRE) tal como se describe a continuación inmediatamente antes de la recolección de orina.

Aplice suficiente presión sobre la próstata para deprimir la superficie aproximadamente 1 cm desde la base al ápice y desde la línea lateral hacia la línea media de cada uno de los lóbulos, como se muestra en la Figura 1. Realice exactamente tres presiones en cada lóbulo. Esto no pretende ser un masaje de próstata.

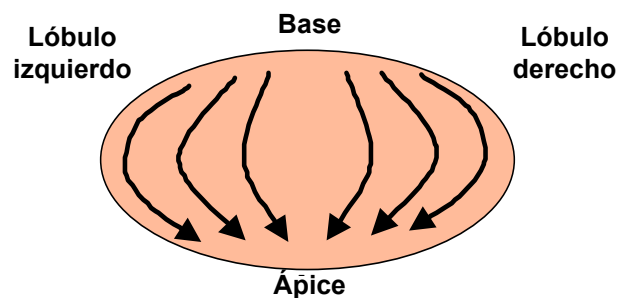


Figura 1. Dirección apropiada de la presión aplicada a la próstata

3. Después del examen digital rectal (DRE), el paciente debe proporcionar el primer chorro de orina (aproximadamente 20 a 30 mL de la orina inicial) en un vaso de recolección de orina debidamente etiquetado. Este espécimen debe ser la primera descarga de orina después del DRE. Use un vaso para recolección de orina sin ningún conservante. Si el paciente no puede detener el flujo de orina y proporciona más de los primeros 20 a 30 mL solicitados, conserve el volumen total. Si el paciente no puede proporcionar el volumen de orina solicitado, se requieren por lo menos 2,5 mL de orina para realizar el ensayo Progensa PCA3. De lo contrario, el espécimen debe rechazarse.

Nota: Los volúmenes muy grandes de orina pueden disminuir las concentraciones de analitos de PCA3 y PSA, y pueden, si bien no es frecuente, producir un espécimen no válido. Por lo tanto, el paciente deberá tratar de no llenar del todo el vaso de recolección de orina.

4. Los especímenes de orina no procesados se deben mantener entre 2 °C y 8 °C o en hielo si no se van a procesar inmediatamente. Se debe transferir el espécimen de orina frío no procesado al tubo de transporte de especímenes dentro de las cuatro horas después de su recolección. Si no, el espécimen debe rechazarse y obtenerse un nuevo espécimen. No congele especímenes de orina no procesados.

5. Para procesar los especímenes de orina, tape bien el tubo e invierta cinco veces los especímenes de orina para volver a suspender las células. Quite el tapón del tubo de transporte de los especímenes de orina y transfiera 2,5 mL de la orina recolectada en el tubo con la pipeta de transferencia desechable suministrada. El volumen de orina correcto se alcanza cuando el nivel del fluido se encuentra entre las líneas de llenado negras en la etiqueta del tubo de transporte de especímenes de orina.
6. Vuelva a tapar bien el tubo de transporte de especímenes de orina e invierta cinco veces para mezclar. Esto se conoce ahora con el nombre de espécimen de orina procesado.

B. Transporte y almacenamiento de especímenes antes de la prueba:

1. Los especímenes de orina procesados se deben transportar al laboratorio en el tubo de transporte de especímenes de orina. Estos pueden enviarse en las condiciones ambientales (sin control de temperatura) o congelados. Se deberá determinar el modo de envío para asegurarse de que el laboratorio reciba los especímenes dentro de los 5 días después de su recolección.

Al recibir el envío, el laboratorio debe verificar la fecha de recolección del espécimen en el tubo. Si el espécimen se envió en las condiciones ambientales y se recibe más de 5 días después de su recolección, este deberá rechazarse y deberá pedirse un nuevo espécimen. El laboratorio puede almacenar los especímenes a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta 14 días antes de que deba desecharse. Si se necesitan períodos de tiempo más largos, consulte la Tabla 2 para determinar el tiempo de almacenamiento permitido según las diferentes temperaturas.

Tabla 2: Duración del almacenamiento de especímenes de orina procesados

Temperatura de almacenamiento	Tiempo
Almacenamiento y envío de especímenes procesados:	Hasta 5 días*
Después de recibido en el laboratorio:	
De 2 °C a 8 °C	Hasta 14 días
De -35 °C a -15 °C	Hasta 11 meses**
A -65 °C o menos	Hasta 36 meses**

*Tiempo permitido para envío en las condiciones ambientales o congelados.

**Tiempo permitido después de almacenarse congelados.

2. Los especímenes de orina procesados no se deben someter a más de cinco ciclos de congelación y descongelación.

C. Almacenamiento de especímenes después de la prueba:

1. Las muestras analizadas deben conservarse en posición vertical en una gradilla.
2. Si los tubos de transporte de especímenes de orina no se vuelven a tapar con un tapón intacto, deberán cubrirse con una barrera de plástico o de aluminio limpia.
3. Si fuera necesario congelar o enviar los especímenes a los que se les haya realizado el ensayo, retire los tapones perforables de los tubos de transporte de los especímenes de orina y sustitúyalos por tapones nuevos no perforables. Si es necesario enviar los especímenes a otro centro para su análisis, deben mantenerse las temperaturas recomendadas. **Evite las salpicaduras y la contaminación cruzada.**

Nota: Los especímenes deben enviarse de acuerdo con las normativas de transporte nacionales e internacionales aplicables.

Procedimiento de la prueba

A. Preparación de la zona de trabajo

1. Prepare un baño de agua a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preamplificación, un segundo baño de agua a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para amplificación y un tercer baño de agua a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para postamplificación. Asegúrese de que los baños contienen agua suficiente (consulte *Notas sobre el procedimiento*). Si se usa el Baño de calor seco/Agitador de vórtice SB100, consulte la *Hoja de aplicación de SB100 Dry Heat Bath/Vortexer para el ensayo Progensa PCA3 (hoja de aplicación SB100)*.
2. Antes de iniciar el ensayo, limpie las superficies de trabajo y las pipetas con una solución de hipoclorito de sodio del 2,5 % al 3,5 % (0,35 M a 0,5 M). Deje la solución de hipoclorito de sodio en contacto con las superficies y las pipetas por lo menos durante 1 minuto y luego enjuague con agua. No deje que la solución de hipoclorito de sodio se seque. Cubra la superficie de la mesa donde se vaya a realizar la reacción con una cubierta absorbente con forro de plástico para mesas de laboratorio limpia.
3. Coloque una cantidad suficiente de casetes de diez puntas en el sistema de captura seleccionada (TCS). Asegúrese de que el frasco de lavado del TCS esté lleno de solución de lavado y de que el aspirador esté conectado a la bomba de vacío. (Consulte el *Manual del usuario del sistema de captura seleccionada*.)

B. Reconstitución y preparación de los reactivos

La reconstitución de los reactivos se debe realizar antes de iniciar la transferencia de los especímenes.

1. Para reconstituir los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda, combine los frascos de los reactivos liofilizados con la solución de reconstitución. Si están refrigeradas, deje que las soluciones de reconstitución alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlas.

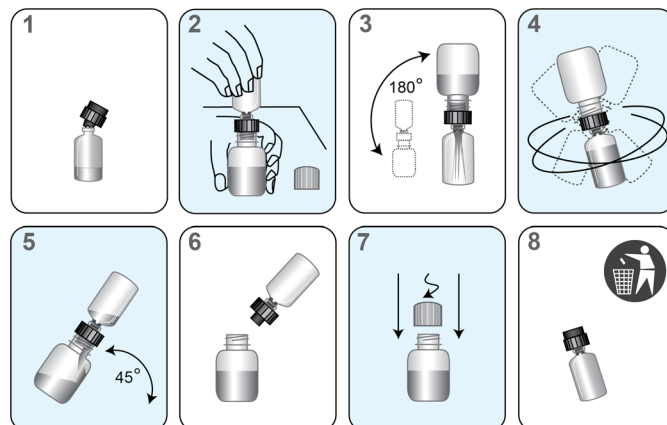


Figura 2. Proceso de reconstitución

- a. Se debe emparejar la solución de reconstitución adecuada con su reactivo seco. Verifique que las etiquetas de los viales tienen correspondencia de colores para asegurarse de que fueron emparejadas correctamente.
- b. Abra el vial del reactivo liofilizado e inserte firmemente el extremo ranurado del collar de reconstitución en la abertura del vial (Figura 2, paso 1).
- c. Abra la solución de reconstitución correspondiente y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta. A la vez que sujeta el frasco de la

- solución sobre la mesa del laboratorio, inserte firmemente el otro extremo del collar de reconstitución en la abertura del frasco (Figura 2, paso 2).
- Invierta lentamente los frascos acoplados. Deje que la solución escurra del frasco al interior del vial de vidrio (Figura 2, paso 3). Espere a que el reactivo liofilizado pase a la solución y luego agite por rotación suave la solución en el vial de vidrio para mezclarla. Evite que se forme espuma al agitar el frasco (Figura 2, paso 4).
 - Invierta los frascos e inclínelos en un ángulo de 45° para reducir a un mínimo la formación de espuma (Figura 2, paso 5). Deje que escurra todo el líquido de nuevo en el frasco de plástico.
 - Retire el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 2, paso 6).
 - Vuelva a tapar el frasco de plástico (Figura 2, paso 7). Escriba las iniciales del usuario y la fecha de reconstitución en todos los viales de reactivos de reconstitución. Asegúrese de registrar el analito (PCA3 o PSA) en los viales de los reactivos de sonda.
 - Deseche el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 2, paso 8).
- Los reactivos de sonda, de amplificación y enzimático reconstituidos anteriormente deben estar a la temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes de iniciar el ensayo. Consulte *Requisitos de almacenamiento y manipulación* si está agrupando sobrantes de reactivos. Si el reactivo de amplificación reconstituido contiene precipitados que no se disuelven a temperatura ambiente, caliente a 62 °C ± 1 °C durante 1 a 2 minutos en el área de preamplificación. Si el reactivo de sonda reconstituido contiene precipitados que no se disuelven a temperatura ambiente, caliente a 62 °C ± 1 °C durante 1 a 2 minutos en el área de postamplificación. Después de los pasos de calentamiento, los reactivos reconstituidos se pueden usar aunque queden residuos del precipitado. Después de la resuspensión, mezcle bien los viales con un movimiento de inversión suave.

C. Preparación de las gradillas

La pipeta de repetición usada en la captura seleccionada, la transferencia de especímenes y la amplificación debe utilizarse solo en estos pasos (consulte *Advertencias y precauciones*).

- Configure una gradilla para el analito PCA3 y otra para el analito PSA.
Nota: Si la cantidad de especímenes es lo suficientemente baja, se pueden analizar ambos analitos en una misma gradilla. Si se usa el instrumento *TECAN Freedom EVO 100/4*, se deben mantener gradillas separadas para cada analito. No se deben analizar más de dos gradillas completas (20 TTU) a la vez.
- Coloque suficientes TTU en las gradillas de las unidades de 10 tubos (TTU) para acomodar los calibradores, controles y especímenes para cada analito.
- Etiquete las TTU con las identificaciones de las muestras/especímenes. En la Tabla 3 se describe la adición de los calibradores, controles y especímenes. Inicie los calibradores PSA en una TTU nueva.

Nota: Los calibradores se deben analizar en tres replicados y los controles en dos replicados cada uno y deben analizarse en la misma gradilla que los especímenes. Los especímenes se deben analizar por duplicado. No deje tubos de reacción vacíos entre los calibradores, controles y especímenes. Si usa el instrumento *TECAN Freedom EVO 100/4*, consulte la Hoja de aplicación *TECAN Freedom EVO 100/4* para el ensayo Progensa PCA3 (Hoja de aplicación *TECAN Freedom EVO*) para obtener más información.

Tabla 3: Ejemplo de distribución de la gradilla

Gradilla Posición	Muestra Descripción	*Concentración PCA3 diana (copias/mL)	*Concentración PSA diana (copias/mL)
de 1 a 3	Calibrador 1	0	0
de 4 a 6	Calibrador 2	250	7.500
de 7 a 9	Calibrador 3	2.500	75.000
de 10 a 12	Calibrador 4	25.000	750.000
de 13 a 15	Calibrador 5	125.000	3.000.000
de 16 a 17	Control A	1.250	37.500
de 18 a 19	Control B	62.500	1.500.000
20 a n	Espécimen	Desconocido	Desconocido

*Los calibradores y controles positivos PCA3 y PSA tienen valores asignados, de manera que los valores copias/mL reales para los calibradores 2 a 5 y los controles A y B serán ligeramente diferentes de las concentraciones diana que figuran en la tabla y variarán de un lote a otro. La información sobre las concentraciones se proporciona en una tarjeta en el envase de los viales de los calibradores y los controles y se utiliza para la calibración y determinación de la validez del ciclo.

D. Verificación de la información de la concentración

Verifique con el administrador del sistema del software ProgenSA para ensayos PCA3 que se ha ingresado la información de la concentración para los lotes de los kits de calibradores y controles de ProgenSA PCA3 y PSA analizados. Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia rápida para el ensayo ProgenSA PCA3 (Guía de referencia rápida)* o el *Manual del administrador del software ProgenSA para ensayos PCA3*.

Nota: La información de la concentración se necesita **antes de usar por primera vez** cada nuevo lote de un kit de calibradores y controles. Los ciclos subsiguientes con calibradores y controles del mismo kit no requieren ningún otro procedimiento.

E. Configuración de Worklist Editor

Genere una lista de trabajo de un ciclo del ensayo con el Hologic Worklist Editor en un ordenador situado en el área de preamplificación. Para el uso de Worklist Editor, consulte la *Guía de referencia rápida* o el *Manual del operador de Hologic Worklist Editor*. Si se usa el instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte también la *Hoja de aplicación del TECAN Freedom EVO* para obtener más información.

F. Preparación de la muestra

1. Antes del procesamiento, deje que los calibradores y controles alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien los viales con un movimiento de inversión suave.
2. Antes del análisis, deje que los especímenes alcancen la temperatura ambiente. **No agite las muestras en un mezclador vórtex.** Los especímenes se deben mezclar por inversión suave y ocasional durante el periodo de calentamiento. Consulte *Notas sobre el procedimiento* para obtener más información sobre el precipitado que no pasa a la solución y sobre la manipulación de especímenes congelados.

G. Preamplificación

El ambiente de preamplificación debe mantenerse de 15 °C a 30 °C. Analice ambas gradillas en paralelo. Si se usa el baño de calor seco/agitador de vórtice SB100, consulte la *Hoja de aplicación SB100*. Si se usa el instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte la *Hoja de aplicación del TECAN Freedom EVO* para obtener más información.

1. Mezcle bien los reactivos de captura seleccionada (TCR) por rotación o inversión. Use el pipetador automático para añadir 100 µL del TCR específico del analito al tubo de reacción adecuado.
2. Perfore el tapón del vial del calibrador con el micropipetador y añada 400 µL al tubo de reacción correctamente etiquetado. Con la misma punta de pipeta, extraiga adiciones de replicado del vial a través del tapón perforado. Use una punta de pipeta nueva para cada vial de calibrador. Repita para la adición de los controles y especímenes. Cubra y guarde cualquier espécimen sobrante y almacene a 8 °C o menos (consulte *Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes* para obtener más información) en caso de que necesite volver a realizar la prueba.
3. Cubra los TTU con las tarjetas de sellado y sacuda suavemente la gradilla con la mano. **No utilice un agitador de vórtice.** Incube la gradilla a 62 °C ± 1 °C en un baño de agua durante 30 ± 5 minutos.
4. Retire la gradilla del baño de agua y seque la base de los tubos sobre un material absorbente.
5. Asegúrese de que las tarjetas de sellado estén asentadas correctamente. De ser necesario, reemplácelas con tarjetas de sellado nuevas y selle bien las TTU.
6. Agite la gradilla durante 60 segundos en el mezclador vorticial multitubos (consulte *Notas sobre el procedimiento*). Comience la agitación vorticial dentro de los 2 minutos después de haber retirado la gradilla del baño de agua.
7. Sin retirar las tarjetas de sellado, incube la gradilla a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
8. Coloque la gradilla con la ficha delantera hacia adelante sobre la base magnética del TCS durante 5 a 10 minutos. Cargue la gradilla de TTC con las TTC.
9. Cee las líneas de la bomba de la estación de suministro bombeando solución de lavado a través del peine múltiple de distribución. Bombeo suficiente líquido a través del sistema de forma que no haya burbujas de aire en la línea y que las diez boquillas suministren un flujo continuo de líquido.
10. Encienda la bomba de vacío y desconecte el peine múltiple de aspiración de la primera conexión entre dicho múltiple y la botella trampa. Asegúrese de que el medidor de vacío cumple las especificaciones de la prueba de fugas. Pueden pasar 15 segundos hasta que se alcance esta lectura. Vuelva a conectar el peine múltiple y asegúrese de que el medidor de vacío cumple las especificaciones del nivel de vacío. Deje encendida la bomba de vacío hasta que finalicen todos los pasos de la captura seleccionada y el tubo del peine múltiple de aspiración esté seco.

Consulta la Hoja de especificaciones del nivel de vacío de sistema de captura seleccionada al final del *Manual del usuario del sistema de captura seleccionada* o póngase en contacto con el departamento de atención al cliente de Hologic para obtener más información.

11. Acople firmemente el peine múltiple de aspiración al primer conjunto de puntas. Baje las puntas a la primera TTU hasta que entren en contacto con la parte superior del líquido. Mientras las puntas descienden, mantenga el contacto con la parte superior del líquido hasta que entren en contacto brevemente con las bases de los tubos. Dé golpecitos suavemente con las puntas en las bases de los tubos hasta eliminar todos los restos de líquido. No mantenga las puntas en contacto prolongado con las bases de los tubos ni dé golpecitos con ellas rápidamente porque puede crearse un exceso de espuma en la trampa de vacío.

12. Una vez finalizada la aspiración, expulse las puntas en el casete de puntas original. Repita los pasos de aspiración con el resto de las TTU, usando una punta dedicada para cada tubo de reacción.
13. Coloque el peine múltiple de distribución sobre cada TTU y, con la bomba de la estación de suministro, añada 1,0 mL de solución de lavado a cada uno de los tubos de la TTU.
14. Cubra los tubos con una tarjeta de sellado y retire la gradilla del TCS. Agite una vez en el mezclador vorticial multitubos. Consulte *Notas sobre el procedimiento* para obtener más información.
15. Coloque la gradilla sobre la base magnética del TCS entre 5 y 10 minutos.
16. Aspire todo el líquido como se indica en Pasos 11 y 12.
17. Después de la aspiración final, retire la gradilla de la base del TCS e inspeccione los tubos visualmente para asegurarse de que todo el líquido se ha aspirado y de que todos los tubos contienen granos de partículas magnéticas. Si hay líquido visible, coloque la gradilla nuevamente en la base del TCS durante 2 minutos y repita la aspiración de la TTU con las mismas puntas utilizadas anteriormente para cada tubo de reacción. Se puede aceptar el tubo si después de terminada la aspiración se puede ver ALGÚN grano de partículas magnéticas. Si no se puede ver ningún grano, el espécimen debe volverse a evaluar. Si el mismo espécimen no contiene granos de partículas magnéticas en este paso en un ciclo subsiguiente, podríamos encontrarnos ante un problema específico del espécimen. En este caso se recomienda recolectar nuevamente un espécimen de orina.

H. Amplificación

Nota: La adición de enzimas a una gradilla de reacción (Pasos 6 y 7 a continuación) debe realizarse en 90 segundos o menos.

Realice los Pasos 6 y 7 en una gradilla antes de repetirlo en la segunda gradilla. Si se usa el baño de calor seco/agitador de vórtice SB100, consulte la *Hoja de aplicación SB100*. Si se usa el instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte la *Hoja de aplicación del TECAN Freedom EVO* para obtener más información.

1. Con la pipeta de repetición, añada 75 µL del reactivo de amplificación específico del analito reconstituido a cada uno de los tubos de reacción. Todas las mezclas de reacción de la gradilla deben ser ahora de color rojo.
2. Con la pipeta de repetición, añada 200 µL de reactivo de aceite.
3. Cubra los tubos con una tarjeta de sellado y agite en el mezclador vorticial multitubos.
4. Incube la gradilla en un baño de agua de preamplificación a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 5 minutos.
5. Transfiera la gradilla a un baño de agua a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 ± 2 minutos.
6. Con la gradilla en el baño de agua, retire con cuidado la tarjeta de sellado y, con el pipetador automático, añada 25 µL del reactivo enzimático reconstituido a cada una de las mezclas de reacción. Todas las reacciones deben ser ahora anaranjadas.
7. Cubra los tubos inmediatamente con tarjetas de sellado nuevas, retire del baño de agua y mezcle rápidamente los reactivos agitando suavemente la gradilla con la mano.

Nota: Reduzca al mínimo el tiempo que la gradilla está fuera del baño de agua para evitar que los tubos se enfrien.

8. Incube la gradilla a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 ± 5 minutos.

I. Post-amplificación

El pipetador automático usado en la hibridación y selección debe utilizarse solo en estos pasos (consulte *Advertencias y precauciones*). En ambiente de postamplificación, incluso detección, debe mantenerse de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si se usa el baño de calor seco/agitador de vórtice SB100, consulte la *Hoja de aplicación SB100*.

1. Hibridación

- Retire la gradilla del baño de agua de preamplificación y transfiera al área de postamplificación. Use el pipetador automático para añadir $100\text{ }\mu\text{L}$ del reactivo de sonda específico del analito reconstituido. Todas las mezclas de las reacciones deben ser ahora amarillas.
- Cubra los tubos con una tarjeta de sellado y agite en el mezclador vorticial multitubos durante 10 segundos o hasta que el color sea uniforme.
- Incube la gradilla a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua durante 20 ± 5 minutos.
- Retire la gradilla del baño de agua e incube a temperatura ambiente durante 5 ± 1 minutos.

2. Selección

- Con una pipeta de repetición, añada $250\text{ }\mu\text{L}$ de reactivo de selección a cada uno de los tubos de reacción. Todas las reacciones deben ser ahora de color rosado.
- Cubra los tubos con una tarjeta de sellado, use el agitador de vórtice durante 10 segundos, o hasta que el color sea uniforme, e incube la gradilla en un baño de agua a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 1 minutos.
- Retire la gradilla del baño de agua. Incube la gradilla a temperatura ambiente durante 15 ± 3 minutos.

J. Detección

Para usar el luminómetro Leader HC+ consulte el *Manual del operador del luminómetro Leader HC+*. Para el uso del software Progensa para ensayos PCA3, consulte la *Guía de referencia rápida* o el *Manual del administrador del sistema y el Manual del operador del software Progensa para ensayos PCA3*.

- Prepare el luminómetro Leader HC+ colocando una TTU vacía en la posición del casete número 1 y ejecutando el protocolo WASH (LAVADO).
- Asegúrese de que se dispone de volúmenes suficientes de Auto Detect 1 y 2 para completar las reacciones.
- Cargue las TTU en el luminómetro usando el diagrama del luminómetro como guía. Si se analizan ambos analitos (ciclo consecutivo), cargue primero todas las PCA3, seguidas inmediatamente de todas las TTU de PSA.
- Inicie la sesión en el ordenador. Haga clic en **NEW RUN (NUEVO CICLO)** y seleccione el protocolo adecuado y las concentraciones de ensayo correspondientes. Haga clic en **NEXT (SIGUIENTE)** para iniciar el ciclo.

Nota: El ciclo debe completarse en las 2 horas siguientes a la finalización de la incubación del paso de selección a $62\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Prepare el fluido de desactivación mezclando volúmenes iguales de solución de hipoclorito de sodio del 5 % al 7 % ($0,7\text{ M}$ a $1,0\text{ M}$) y tampón para fluido de desactivación en un recipiente plástico grande con tapa. Etiquete el recipiente de

plástico y anote la fecha de caducidad. El fluido de desactivación es estable a temperatura ambiente durante 4 semanas.

6. Cuando el ciclo haya terminado, el software del ensayo generará dos informes de ciclos, el Informe de ciclo sin procesar y el Informe de relación, si los ciclos fueron consecutivos (consulte *Procedimientos de control de calidad y Interpretación de los resultados*).
7. Cuando el ciclo haya terminado, retire las TTU usadas del luminómetro y colóquelas en el recipiente con el fluido de desactivación. Mantenga las TTU en el recipiente durante 15 minutos como mínimo antes de desecharlas. El director del laboratorio debe establecer los métodos de manipulación y eliminación adecuados.

Notas sobre el procedimiento

A. Preparación del espécimen

1. Si los especímenes contienen precipitados suspendidos, caliéntelos a 37 °C no más de 5 minutos seguidos con un movimiento de inversión suave. En el caso de que el precipitado no se disuelva, cerciórese de que el precipitado no obstaculice la entrega del espécimen.
2. Los especímenes congelados deben descongelarse a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C, se puede usar un baño de agua) con inversión ocasional durante el periodo de descongelación para evitar la formación de un tapón insoluble. Mezcle bien los viales con un movimiento de inversión suave una vez que el hielo interior se haya descongelado lo suficiente como para quedar suelto y moverse libremente. Continúe el calentamiento hasta que el espécimen esté completamente descongelado y vuelva a mezclar los viales con un movimiento de inversión suave.
 - a. Si se forman tapones y los especímenes van a ser pipeteados con el instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, vuelva a congelarlos y repita las instrucciones de descongelación asegurándose de que no se forman tapones. Si fuera imposible eliminar el tapón, el espécimen deberá pipetarse manualmente.
 - b. Si se forma un tapón y los especímenes deben pipetarse manualmente con un micropipetador, no se requiere ningún otro procedimiento excepto asegurarse de que el tapón no obstaculice la entrega del espécimen.

B. Pipetado de controles, calibradores y especímenes

1. Se debe añadir un volumen de 400 µL de calibrador, control o espécimen a la TTU. Se recomienda comprobar visualmente la cantidad pipeteada en la TTU para asegurarse de que se ha transferido el volumen adecuado. Se necesita el volumen adecuado para obtener resultados precisos.
2. Asegúrese de que la punta de la pipeta está asentada correctamente en el pipetador y verifique que el volumen sea el correcto. Se recomienda verificar visualmente el volumen al final de cada TTU (cada 10 tubos). Libere lentamente y a ritmo constante el émbolo de la pipeta al extraer una muestra, para evitar formar espuma y burbujas.

C. Reactivos

1. La solución de reconstitución de sonda se puede sedimentar mientras está almacenada. Caliente la solución a 62 °C ± 1 °C durante 1 a 2 minutos. Después de este paso de calentamiento, la solución de reconstitución de sonda puede utilizarse aunque queden residuos del precipitado. Después de la resuspensión, mezcle el vial con un movimiento de inversión suave.

2. Cuando realice el pipeteo de los reactivos que no son enzimas, apunte ligeramente hacia el lateral de la parte inferior del tubo de reacción (donde la parte inferior del tubo se curva hacia arriba para encontrarse con las partes laterales). Al realizar el pipeteo del reactivo enzimático, apunte directamente al centro del tubo de reacción. Confirme visualmente que los reactivos se están surtiendo correctamente (que no hay una cantidad excesiva de reactivo en los laterales de los tubos y que se produce el cambio de color apropiado).

D. Temperatura

1. Los pasos de captura seleccionada, amplificación, hibridación y selección dependen de la temperatura. Por lo tanto, es imperativo que los baños de agua se mantengan dentro de los rangos de temperatura especificados.
2. La temperatura ambiente se define entre 15 °C y 30 °C.

E. Tiempo

Las reacciones de captura seleccionada, amplificación, hibridación y selección dependen del tiempo. Cumpla con los tiempos especificados en *Procedimiento de la prueba*.

F. Agitación de vórtice

La agitación de vórtice correcta es importante para el desarrollo satisfactorio del ensayo Progensa PCA3. Para las reacciones de vórtice, seleccione en el mezclador vorticial multitubos la velocidad más baja, fije la gradilla y encienda el aparato. Aumente la velocidad lentamente hasta que el líquido suba a la mitad del tubo. Agite durante 10 segundos, la cantidad de tiempo indicada, o hasta que el color sea uniforme. Baje la velocidad al mínimo antes de apagar el mezclador vorticial multitubos y retire la gradilla. Las mezclas de los reactivos nunca deben tocar las tarjetas de sellado.

G. Baños de agua

1. El nivel de agua en los baños de agua debe mantenerse a una profundidad entre 3,8 y 5,0 cm (1,5 y 2,0 pulgadas), medido desde la bandeja de metal de soporte (en el fondo del baño de agua) hasta la superficie del agua. Esto garantiza la transferencia de calor adecuada.
2. Para evitar la contaminación cruzada, los baños de agua deben estar dedicados a un paso específico del ensayo.

H. Descontaminación

1. Superficies y pipetadores

Las superficies de la mesa del laboratorio y las pipetas se deben descontaminar periódicamente con una solución de hipoclorito de sodio del 2,5 % al 3,5 % (0,35 M a 0,5 M). Deje la solución de hipoclorito de sodio en contacto con las superficies durante 1 minuto como mínimo y luego enjuague con agua. **No deje que la solución de hipoclorito de sodio se seque.** Las soluciones de cloro pueden picar el equipo y el metal. Enjuague bien el equipo con agua para evitar que se pique.

2. Peine múltiple de aspiración del TCS

Después de cada uso:

- a. Aparte el peine múltiple de distribución.
- b. Coloque una nueva TTC en la gradilla. Encienda la bomba de vacío. Conecte el peine múltiple de aspiración a las puntas de la TTC. Aspire toda la solución de lavado que quede en la estación de suministro del colector de cebado.

- c. Vierta al menos 100 mL de solución de hipoclorito de sodio del 0,5 % al 0,7 % (de 0,07 M a 0,1 M) o, si se prefiere, del 2,5 % al 3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M), en el colector de cebado. Aspire toda la solución mediante el peine múltiple de aspiración.
 - d. Vierta al menos 100 mL de agua desionizada en el colector de cebado. Aspire toda el agua mediante el peine múltiple de aspiración.
 - e. Expulse las puntas a su TTC original.
 - f. Deje encendida la bomba de vacío hasta que el tubo del peine múltiple esté seco para evitar que el flujo vuelva (unos 3 minutos).
 - g. Descontamine las superficies del peine múltiple de aspiración tal como se describe en *Unidad TCS*.
3. Recipiente de desechos TCS

Limpie el frasco de desechos al menos una vez a la semana o cuando alcance el 25 % de su capacidad, lo que suceda primero.

 - a. Apague la bomba de vacío y deje que la presión de vacío se iguale.
 - b. Libere los accesorios de conexión rápida entre el frasco de desechos y el frasco de sobreflujo y entre el frasco de desechos y el peine múltiple de aspiración.
 - c. Retire el frasco de desechos de la cubierta de la trampa de vacío.
 - d. Retire la tapa y añada cuidadosamente 400 mL de solución de hipoclorito de sodio del 5 % al 7 % (de 0,7 M a 1,0 M) al frasco de desechos de 4 L.

Nota: Esto se puede llevar a cabo en una campana extractora de humos para evitar liberar gases en el laboratorio.

 - e. Tape el frasco de desechos y agite con una rotación suave el contenido hasta que quede completamente mezclado.
 - f. Deje que el frasco de desechos repose durante al menos 15 minutos y, a continuación, deseche el contenido (los desechos).
 - g. Enjuague el frasco de desechos con agua para eliminar todo resto de desechos internos.
 - h. Tape el frasco de desechos vacío y colóquelo en la cubierta de la trampa de vacío. Conecte los accesorios de conexión rápida a la unidad TCS. Deseche los guantes con cuidado.
4. Unidad TCS

Limpie las superficies de la unidad TCS, el peine múltiple de aspiración y las puntas eyectoras del tampón de lavado con toallas de papel humedecidas con una solución de hipoclorito de sodio del 2,5 % al 3,5 % (0,35 M a 0,5 M). Después del paso de la solución de hipoclorito de sodio, enjuague con agua y luego seque bien las superficies con toallas de papel.
5. Gradillas

Sumerja las gradillas en una solución de hipoclorito de sodio del 2,5 % al 3,5 % (0,35 M a 0,5 M), asegurándose de que queden cubiertas por la solución. Mantenga las gradillas sumergidas durante 10 minutos. Una exposición más prolongada puede dañar las gradillas. Enjuague bien con agua y seque con toallas de papel.
- I. Contaminación de los ensayos
 1. Si no se toman suficientes precauciones durante el procedimiento del ensayo pueden introducirse materiales contaminantes.

2. Las TTU deben descontaminarse con fluido de desactivación tal como se describe en el *Procedimiento de la prueba*. No reutilice las TTU.
3. Descontamine periódicamente el equipo y las superficies de trabajo tal como se describe anteriormente en *Descontaminación*.
4. Al igual que en cualquier otro sistema de reactivos, el exceso de talco de algunos guantes puede contaminar los tubos abiertos. Se recomienda el uso de guantes sin talco.

Procedimientos de control de calidad

A. Validez del ciclo

1. Los calibradores y los controles se deben operar con todos los ensayos y en la misma gradilla que los especímenes de prueba. Para que el ciclo se considere válido, se deben cumplir los criterios siguientes:

Promedio de RLU del Calibrador 2 > Punto de corte de RLU

Donde Punto de corte de RLU = Promedio de RLU del Calibrador 1
 + 1,645 desviaciones estándar de los replicados de RLU del Calibrador 1
 + 1,645 desviaciones estándar de los replicados de RLU del Calibrador 2.

Promedio interpolado de recuperación del Calibrador 5 = $100 \pm 30 \%$

Promedio interpolado de recuperación del Control A = $100 \pm 60 \%$

Promedio interpolado de recuperación del Control B = $100 \pm 35 \%$

2. El software del PCA3 evalúa automáticamente los resultados contra los criterios anteriores y presenta el estado del ciclo como PASS (PASA) si se cumplen los criterios de validez o como FAIL (NO PASA) si los criterios no se cumplen.
3. Si el estado del ciclo es FAIL (NO PASA), los resultados de las pruebas del mismo ciclo no son válidos para ese analito y no se deben presentar.
4. Si el ciclo no es válido, se deberá repetir para ese analito (consulte *Interpretación de los resultados*). Si el ciclo para el otro analito es válido, dichos resultados se pueden usar en el análisis de datos con el ciclo válido repetido del primer analito.

B. Validez del espécimen

Dentro de un ciclo válido, los resultados individuales de los especímenes pueden considerarse INVALID (NO VÁLIDOS) y así lo indicará el Informe de ciclo sin procesar (consulte *Interpretación de los resultados*). Aunque los replicados individuales de un espécimen sean válidos, el espécimen se considerará no válido si la diferencia c/mL interpolada entre los replicados excede el 600 %. Se deben repetir las pruebas del espécimen para dicho analito.

Interpretación de los resultados

A. Tipos de informes

1. Informe de ciclo sin procesar

El Informe de ciclo sin procesar suministra información sobre la validez del ciclo (PASS [PASA] o FAIL [NO PASA]; consulte *Procedimientos de control de calidad*) y sobre los tubos de reacción individuales analizados con el ensayo Progensa PCA3. Si un ciclo no es válido (FAIL [NO PASA]), todos los tubos del ciclo se etiquetan como no válidos. No obstante, los tubos individuales pueden considerarse no válidos en un ciclo válido (PASS [PASA]). Para ciclos consecutivos (ej., se analizan los analitos PCA3 y PSA en el mismo ciclo del ensayo), el ciclo de un analito puede no ser válido mientras que el ciclo del otro analito sí es válido.

El Resumen de excepciones se encuentra al final del Informe de ciclo sin procesar. En ciclos consecutivos donde los ciclos de ambos analitos son válidos, los especímenes del Resumen de excepciones pueden necesitar un nuevo análisis de uno de los analitos. Aunque el resultado PCA3 Score puede figurar en el Resumen de excepciones, no se considera que se deba incluir este resultado hasta que se realice una correspondencia manual y el resultado figure en el Informe de relación. Si solo se analizó un analito o si un ciclo de analitos no es válido, todos los especímenes analizados figurarán en el Resumen de excepciones.

2. Informe de relación

El software del ensayo genera automáticamente un Informe de relación para un ciclo consecutivo donde ambos ciclos de analitos son válidos. El programa calcula y lista el PCA3 Score del espécimen en el Informe de relación. Los especímenes del Informe de relación no requieren ningún otro análisis o ambos deben ser analizados nuevamente. Los especímenes que no figuran en el Informe de relación se encuentran en la sección Resumen de excepciones del Informe de ciclo sin procesar.

También se puede generar un Informe de relación después de establecer la correspondencia manual (consulte *Correspondencia manual* para obtener más información).

3. Informe de control de calidad (QC)

El informe QC muestra los criterios de validez de un ciclo del ensayo, las concentraciones asignadas o interpoladas y las recuperaciones de los calibradores y controles. El informe muestra también los parámetros que definen la curva (3) de calibración de la respuesta a la dosis logística de los cuatro parámetros. Para obtener más información, consulte el *Manual del usuario del software Progensa para ensayos PCA3*.

B. Correspondencia

1. Correspondencia automática

En ciclos consecutivos donde ambos ciclos del analito son válidos, el programa establece la correspondencia automática del PCA3 individual y los resultados del analito PSA para especímenes y determina el PCA3 Score (si es calculable). Los resultados figuran en el Informe de relación o Resumen de excepciones del Informe de ciclo sin procesar.

2. Correspondencia manual

Cuando se analizan los analitos PCA3 y PSA en ciclos diferentes, el programa no puede determinar automáticamente el PCA3 Score. La correspondencia manual de los resultados del analito es necesaria para determinar el PCA3 Score o el rango del PCA3 Score (consulte la *Guía de referencia rápida* o el *Manual del usuario del software Progensa para ensayos PCA3*). La correspondencia manual puede ser también necesaria para los resultados que figuran en el Resumen de excepciones del Informe de ciclo sin procesar. Una vez terminada la correspondencia manual, los PCA3 Score de dichos especímenes figuran en el Informe de relación.

C. Informes de interpretación

1. PCA3 Score

Nota: Solo se generan datos para los PCA3 Score y los rangos PCA3 Score que figuran en el Informe de relación. No se generan datos para los resultados que aparecen en el Resumen de excepciones ya que pueden requerir otros procedimientos.

El PCA3 Score se calcula como la proporción de las copias del ARN de PCA3 con las copias del ARN de PSA, multiplicada por 1.000, y solo se puede calcular usando resultados de ciclos y especímenes válidos. Se deberán repetir los ciclos o los especímenes no válidos para ese analito (consulte *Reevaluación* para obtener más información).

Si el PCA3 Score indicado es inferior al punto de corte, el resultado se debe interpretar como NEGATIVO. Si el PCA3 Score es superior o igual al punto de corte, el resultado se debe interpretar como POSITIVO. El director del laboratorio debe establecer el punto de corte (consulte *Características de rendimiento* para obtener más información).

En ciertas condiciones, se suministra un rango PCA3 Score ($>[\text{PCA3 Score calculado}]$ o $<[\text{PCA3 Score calculado}]$). Si $<[\text{PCA3 Score calculado}]$ es inferior al punto de corte, el resultado se debe interpretar como NEGATIVO. Si $>[\text{PCA3 Score calculado}]$ es superior al punto de corte, el resultado se debe interpretar como POSITIVO. Si se requiere un valor numérico, la dilución del espécimen y un nuevo análisis pueden generar un PCA3 Score en lugar de un rango PCA3 Score (consulte *Reevaluación - Dilución de especímenes que superan el rango admitido*).

2. Interpretación de los códigos de estado y de análisis

La columna Estado en el Informe de ciclo sin procesar y en el Informe de relación muestra la información en formato «s:a». Los códigos de estado específicos del ciclo («s») se muestran antes (a la izquierda) de los dos puntos y los códigos de análisis específicos del analito («a») se muestran después (a la derecha) de los dos puntos. Los códigos específicos del analito que se muestran en minúsculas son para los resultados PCA3 y los que se muestran en mayúsculas para los resultados PSA. Cada uno de los informes contiene las descripciones de los códigos de estado y los análisis que aparecen en dicho informe. Por ejemplo, los códigos pueden indicar si el resultado de un espécimen o replicado es válido o se encuentra fuera de rango. Consulte la *Guía de referencia rápida* o el *Manual del usuario del software Progensa para ensayos PCA3* para obtener una lista completa de los códigos de estado y de análisis y más detalles.

Si un PCA3 Score aparece en el Informe de relación y ningún código de estado o análisis aparece en las columnas Estado de PCA3 o PSA, esto indica que el análisis de ambos analitos es válido y se encuentra «dentro del rango». El resultado del espécimen es notificable y no requiere ningún otro procedimiento.

Si aparece un código de estado o análisis en el Resumen de excepciones o en el Informe de relación, puede ser necesario un nuevo análisis (consulte *Interpretación de los resultados en el Resumen de excepciones* y *Interpretación de los resultados en el Informe de relación*). Si los resultados del analito provienen de dos ciclos separados y tienen un código de análisis, encuentre la combinación de ambos analitos en la Tabla 4 o en la Tabla 5 para determinar si es necesario algún otro procedimiento.

Nota: La presencia de un código de estado o de análisis no significa automáticamente que sea necesario un nuevo análisis.

3. Interpretación de los resultados en el Resumen de excepciones

Puede que en el Resumen de excepciones no figure ninguna excepción. En esos casos, no es necesario ningún otro procedimiento.

Si el Resumen de excepciones muestra especímenes para ciclos consecutivos donde los ciclos de ambos analitos son válidos, consulte la Tabla 4 para obtener más instrucciones.

Para los ciclos individuales de analitos, consulte *Interpretación de los códigos de estado y de análisis*. En los ciclos consecutivos donde un ciclo de analitos no es válido, vuelva a analizar el ciclo no válido (consulte *Reevaluación* para obtener más información) y trate los resultados como si se hubieran realizado ciclos individuales de analitos. Será necesario realizar una correspondencia manual de resultados.

Un espécimen se puede etiquetar como no válido aunque los tubos individuales (replicados) se etiqueten como válidos. El resultado combinado de los replicados es el que determina la validez del espécimen mientras que una marcada diferencia entre replicados invalida un espécimen (consulte *Procedimientos de control de calidad* para obtener más información).

Tabla 4: Condiciones del Resumen de excepciones del ensayo ProgenSA PCA3

Resultado PCA3 (Código de análisis*)	Resultado PSA (Código de análisis*)	PCA3 Score listado	¿Otras pruebas?	Acción/comentario
Dentro del rango (sin código)	No válido** (A, B, E, H o I)	--	Sí	Vuelva a evaluar PSA (consulte <i>Reevaluación</i>) y establezca manualmente la correspondencia de resultados.
No alcanza el rango admitido (g)	No válido (A, B, E, H o I)	--	Sí	Vuelva a evaluar PSA (consulte <i>Reevaluación</i>) y establezca manualmente la correspondencia de resultados.
No válido (a, b, e, h o i)	Dentro del rango (sin código)	--	Sí	Vuelva a evaluar PCA3 (consulte <i>Reevaluación</i>) y establezca manualmente la correspondencia de resultados.
Dentro del rango (sin código)	Supera el rango admitido (F)	<[PCA3 Score calculado]***	Opcional	1. Establezca manualmente la correspondencia para obtener el <[PCA3 Score calculado] O BIEN 2. Diluya el espécimen en diluyente de especímenes (consulte <i>Dilución de especímenes que superan el rango admitido</i>), vuelva a evaluar PSA y establezca manualmente la correspondencia de resultados si es necesario un PCA3 Score.

Tabla 4: Condiciones del Resumen de excepciones del ensayo Progensa PCA3 (continuación)

Supera el rango admitido (f)	Dentro del rango (sin código)	>[PCA3 Score calculado]	Opcional	1. Establezca manualmente la correspondencia para obtener el >[PCA3 Score calculado] O BIEN 2. Diluya el espécimen en diluyente de especímenes, vuelva a evaluar PCA3 y establezca manualmente la correspondencia de resultados si es necesario un PCA3 Score.
No alcanza el rango admitido (g)	Dentro del rango (sin código)	<[PCA3 Score calculado]	No	Establezca manualmente la correspondencia para obtener el <[PCA3 Score calculado].
No alcanza el rango admitido (g)	Supera el rango admitido (F)	<[PCA3 Score calculado]	No	Establezca manualmente la correspondencia para obtener el <[PCA3 Score calculado].

*Consulte el *Manual del usuario del software del ensayo Progensa PCA3* para una lista completa de los códigos de análisis.

**Aplicable únicamente a especímenes no válidos dentro de un ciclo válido.

***Para los valores fuera de rango, el PCA3 Score calculado se calcula usando el nivel de copia del calibrador positivo más cercano.

4. Interpretación de los resultados en el Informe de relación

Si un espécimen figura en el Informe de relación con un PCA3 Score, el resultado es un PCA3 Score notificable y no es necesario ningún otro procedimiento. Si no figura ningún PCA3 Score, expresado como «--» en la columna PCA3 Score, consulte la Tabla 5 para obtener instrucciones.

Tabla 5: Condiciones del Informe de relación del ensayo Progensa PCA3

Resultado PCA3 (Código de análisis*)	Resultado PSA (Código de análisis*)	PCA3 Score listado	¿Otras pruebas?	Acción/comentario
Dentro del rango (sin código)	Dentro del rango (sin código)	PCA3 Score	No	No es necesario ningún otro procedimiento; los resultados son notificables.
No válido** (a, b, e, h o i)	No válido (A, B, E, H o I)	--	Sí	Analice nuevamente ambos analitos (consulte <i>Reevaluación</i>).
No válido (a, b, e, h o i)	Supera el rango admitido (F)	--	Sí	Diluya el espécimen en diluyente para especímenes (consulte <i>Dilución de especímenes que superan el rango admitido</i>), vuelva a evaluar ambos analitos.
Supera el rango admitido (f)	No válido (A, B, E, H o I)	--	Sí	Diluya el espécimen en diluyente para especímenes, vuelva a evaluar ambos analitos.
Supera el rango admitido (f)	Supera el rango admitido (F)	--	Sí	Diluya el espécimen en diluyente para especímenes, vuelva a evaluar ambos analitos.
No válido (a, b, e, h o i)	No alcanza el rango admitido (G)	--	No	La muestra no tiene suficiente ARN para un análisis preciso. Se debe recolectar un nuevo espécimen del paciente.
Dentro del rango (sin código)	No alcanza el rango admitido (G)	--	No	La muestra no tiene suficiente ARN para un análisis preciso. Se debe recolectar un nuevo espécimen del paciente.
Supera el rango admitido (f)	No alcanza el rango admitido (G)	--	No	La muestra no tiene suficiente ARN para un análisis preciso. Se debe recolectar un nuevo espécimen del paciente.
No alcanza el rango admitido (g)	No alcanza el rango admitido (G)	--	No	La muestra no tiene suficiente ARN para un análisis preciso. Se debe recolectar un nuevo espécimen del paciente.

Tabla 5: Condiciones del Informe de relación del ensayo Progensa PCA3 (continuación)

*Consulte el *Manual del usuario del software del ensayo Progensa PCA3* para una lista completa de los códigos de análisis.

**Aplicable únicamente a especímenes no válidos dentro de un ciclo válido. Si los especímenes resultaron no válidos debido a un ciclo no válido, los resultados figuran en el Resumen de excepciones (consulte *Interpretación de los resultados en el Resumen de excepciones* para obtener más información).

D. Reevaluación

1. Pautas para la reevaluación

- a. Aunque no es imperativo que ambos analitos se analicen durante el mismo ciclo, **los resultados de ambos analitos deben provenir del mismo vial de muestra para obtener un PCA3 Score notificable.**
- b. Se deben repetir todos los ciclos no válidos y volver a evaluar todos los especímenes no válidos procedentes de ciclos válidos.
- c. Vuelva a evaluar los especímenes utilizando un nuevo juego de calibradores y controles.
- d. Es esencial el almacenamiento adecuado del espécimen sobrante antes de la reevaluación (consulte *Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes* para obtener más información).
- e. Puede ser necesario establecer una correspondencia manual para los analitos PCA3 y PSA para determinar el PCA3 Score (consulte *Correspondencia manual* para obtener más información).

2. Dilución de especímenes que superan el rango admitido

- a. Si la concentración de un espécimen se extrapola a un nivel superior del Calibrador 5 en un ciclo válido, el resultado «supera el rango admitido» y se lo etiqueta con un código de análisis «f» o «F» en los informes de ciclo. La concentración se expresa como >[concentración del Calibrador 5].
- b. Invierta el espécimen de orina procesado para mezclarlo antes de diluirlo. Una dilución recomendada, pero no necesaria, es 1:10 usando el Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. En un vial adecuado, añada 1.800 µL de diluyente para especímenes y 200 µL del espécimen; tape el tubo e inviértalo cinco veces para mezclar completamente. El factor de dilución será «10» en la lista de trabajo del ciclo. Si se repiten las pruebas de ambos analitos, aumentar los volúmenes al doble (usar 3.600 µL de diluyente de especímenes y 400 µL del espécimen). Consulte el prospecto del empaque del Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Analice el espécimen diluido con el ensayo.
- c. Si después de la reevaluación, el resultado del espécimen nuevamente supera el rango admitido, se deberá diluir aún más hasta que el resultado del espécimen se interpole dentro del rango de los calibradores. Se puede hacer otra dilución de la dilución inicial de 1:10, siempre y cuando la dilución inicial de 1:10 se haya almacenado adecuadamente (consulte *Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes* para obtener más información).

Limitaciones

- A. No se debe usar el ensayo Progensa PCA3 para pacientes que están tomando medicamentos que se sabe que afectan los niveles de PSA como finasterida (Proscar, Propecia), dutasterida (Avodart) y terapia de antiandrógenos (Lupron). No se ha evaluado el efecto de estos medicamentos en la expresión del gen PCA3.
- B. Ciertos procedimientos terapéuticos y de diagnóstico como la prostatectomía, radiación, biopsia de próstata y otros, pueden afectar la viabilidad del tejido prostático y repercutir en el PCA3 Score. No se ha evaluado el efecto de estos procedimientos en los resultados del ensayo. Las muestras para el análisis PCA3 deben recolectarse cuando el clínico considere que el tejido prostático se ha recuperado.
- C. El uso del ensayo Progensa PCA3 está limitado al personal capacitado en el procedimiento. El incumplimiento de las instrucciones de este prospecto puede dar lugar a resultados erróneos.
- D. Cada laboratorio deberá validar independientemente el proceso de transferencia LIS.
- E. La fiabilidad de los resultados depende de la recolección adecuada de los especímenes de orina. La capacitación de los clínicos en las técnicas adecuadas de recolección de especímenes de orina es necesaria porque el sistema de transporte que usa el ensayo Progensa PCA3 no permite la evaluación microscópica de la adecuación de los especímenes de orina. Consulte *Recolección, transporte y almacenamiento de especímenes*. Para obtener información detallada, consulte el prospecto suministrado con el Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit.
- F. Los resultados del ensayo Progensa PCA3 deben interpretarse junto con los otros datos de laboratorio y clínicos que se encuentren a disposición del clínico. (La recolección inapropiada de especímenes, errores técnicos o mezcla de especímenes puede afectar los resultados de las pruebas.)

Características de rendimiento

A. Resultados clínicos

1. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

Las características de rendimiento del ensayo Progensa PCA3 se establecieron mediante el uso de especímenes de sujetos inscritos en cuatro clínicas de Norte América geográficamente diversas. La población de sujetos estaba formada por 529 hombres con biopsia de próstata programada. La información demográfica de los sujetos es la siguiente:

- Promedio de edad $\pm$ SD = 64 ± 8 años (media 63, intervalo de 32 a 89)
- Promedio de nivel de suero PSA = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/L}$ (5,6, 0,3 a 484)
- Promedio del volumen de la próstata (determinado por ultrasonido transrectal) = 44 ± 25 cc (39, 5 a 225)
- 34 % (180/529) con biopsia positiva para cáncer de próstata

En la Figura 3 se muestra la correlación de PCA3 Score con la probabilidad de una biopsia de próstata positiva. A medida que aumenta el PCA3 Score, aumenta también la aparición de biopsias de cáncer positivas en los sujetos.

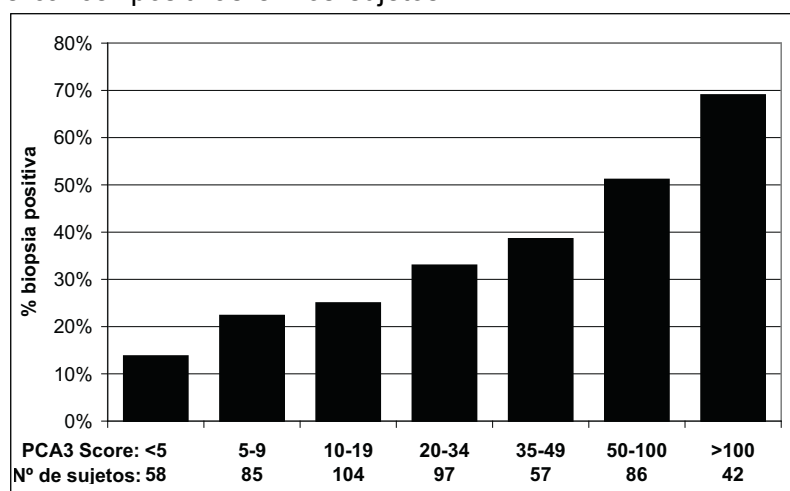


Figura 3. Correlación de PCA3 Score con la probabilidad de biopsias de próstata positivas

Se realizó el análisis de la característica de receptor operativo (ROC) por medio de una biopsia de próstata como método de referencia de acuerdo con CLSI GP10-A (1995) (4). En el ensayo Progensa PCA3, el área debajo de la curva (AUC) fue 0,685 (95 % intervalo de confianza = 0,637 a 0,733). En la Tabla 6 se muestra la sensibilidad y especificidad del diagnóstico en diferentes valores de punto de corte de PCA3 Score. Cada laboratorio debe establecer el punto de corte para la sensibilidad o especificidad del diagnóstico (consulte *Interpretación de los resultados*).

Tabla 6: Sensibilidad y especificidad del diagnóstico del ensayo Progensa PCA3 en diferentes puntos de corte de PCA3 Score

Punto de corte de PCA3 Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilidad	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
Especificidad	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

2. Estudios de la estabilidad de los especímenes

- a. Estabilidad en orina entera: Se realizó la recolección del primer chorro de orina de 10 sujetos y se almacenó entre 2 °C y 8 °C o a 30 °C antes de procesar por medio de la adición al medio de transporte de orina. Después de 4 horas se observó en algunos especímenes almacenados entre 2 °C y 8 °C una importante degradación del ARN de PCA3 y PSA. Por lo tanto, la orina entera se debe procesar antes de las 4 horas. A 30 °C, se observó una importante degradación en menos de una hora. Por lo tanto, la orina entera se debe refrigerar siempre o mantener sobre hielo antes de procesar.
- b. Estabilidad en la orina procesada: Doce especímenes se incubaron a 4 °C o 30 °C hasta un máximo de 38 días. A 4 °C, los ARN de PCA3 y PSA se mantuvieron estables durante 21; a 30 °C, 5 días. Los especímenes almacenados a -20 °C y -70 °C han demostrado la estabilidad del ARN de PCA3 y PSA hasta un máximo de 90 días.
- c. Estabilidad al congelar y descongelar: Se sometieron los especímenes a un ciclo de 37 °C y -70 °C seis veces. No se observó disminución alguna en los niveles de copia del ARN de PCA3 o PSA.

B. Resultados analíticos

1. Sensibilidad analítica

Para evaluar la sensibilidad del ensayo se utilizó un panel de sensibilidad analítica compuesto del transcripto del ARN diluido *in vitro*. Un usuario analizó el panel en veinte ciclos de cinco replicados utilizando un solo lote de reactivos. El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon de acuerdo con CLSI EP17-A (2004) (5). El límite de detección del analito PCA3 fue de 80 c/mL y para el analito PSA fue de 1.438 c/mL. El límite de cuantificación para ambos analitos fue el Calibrador 2.

2. Especificidad analítica

- a. Transcripto sin empalmar: El ensayo Progensa PCA3 fue diseñado para detectar únicamente el ARN de PCA3 sin empalmar en exón 3-exón 4 específico del cáncer de próstata (2). El ensayo no detectó 1 millón c/mL de ARN de PCA3 sin empalmar significativamente sobre el fondo.
- b. La especificidad prostática del ARN de PCA3 en orina: los especímenes de sujetos con prostatectomía posradical (n = 97) se analizaron con el ensayo Progensa PCA3 y los niveles del ARN de PCA3 se compararon con aquellos de los sujetos prebiopsia (n = 464). La media del ARN de PCA3 c/mL estuvo por debajo del límite de detección del ensayo de los especímenes de sujetos con posprostatectomía, mientras que la media del ARN de PCA3 c/mL de los especímenes de sujetos prebiopsia fue de 7.243 c/mL; estos datos confirman que el ARN de PCA3 en orina proviene de la próstata.
- c. Especificidad del tejido: Se extrajo el total de ARN de los tejidos de dos donantes únicos por tipo de tejido, añadido al diluyente de especímenes (10 ng por reacción) y se los analizó con el ensayo Progensa PCA3. El tejido de próstata fue el único tipo detectado por encima del límite de detección de los tipos de tejido del ARN de PCA3 que figuran en la Tabla 7.

Tabla 7: Tipos de tejidos de varón analizados para el ARN de PCA3

Tipo de tejido	
Vejiga (normal)	Riñón
Vejiga (tumor)	Pene
Médula ósea	Próstata
Canales deferentes	Vesícula seminal
Epípidimo	Testículo

- d. Sustancias de interferencia: las sustancias enumeradas en la Tabla 8 se añadieron a las alícuotas de las agrupaciones de orina de varón procesadas. Los especímenes se analizaron con el ensayo Progensa PCA3 de acuerdo con CLSI EP7-A2 (2005) (6). No se observó interferencia al ensayo en las concentraciones listadas.

Tabla 8: Sustancias analizadas para la interferencia de ensayo Progensa PCA3

Agentes terapéuticos		Agentes terapéuticos, continuación	
Sustancia	Concentración de prueba	Sustancia	Concentración de prueba
Acetaminofén y codeína	5,34 µmol/L	Uroxatral (Alfuzosin)	30 mg/L
Atorvastatina	25 mg/L	Doxazosina	1,33 µmol/L
Lisinopril	0,74 µmol/L	Terazosina	7,8 µmol/L
Amlodipino	245 µmol/L	Finasterida	15 mg/L
Atenolol	37,6 µmol/L	Tamsulosina	1,2 µg/L
Sulfasalazina	754 µmol/L	Metformina	310 µmol/L
Esomeprazol	120 mg/L	Sildenafil	12,9 pmol/L
Alopurinol	294 µmol/L	Saw palmetto (Serenoa repens)	1.600 mg/L
Difenhidramina	19,6 µmol/L	Selenio	0,275 mg/L
Acetaminofén	1.324 µmol/L	Constituyentes de la orina	
Ácido acetilsalicílico	3,62 mmol/L		
Ibuprofeno	2.425 µmol/L	Sustancia	Concentración de prueba
Furosemida	181 µmol/L	Ácido úrico	1,4 mmol/L
Ciprofloxacina	30,2 µmol/L	Hemoglobina	2 g/L
Levaquin	48,6 µmol/L	Leucocitos	4,56 x 10 ⁷ células/L
Doxiciclina	67,5 µmol/L	Hematíes	3,06 x 10 ⁷ células/L
Clorhidrato de fluoxetina	11,2 µmol/L	Albumina	50 g/L
Flutamida	1.500 mg/L	Bilirrubina (no conjugado)	342 g/L
Dutasterida	1,5 mg/L	IgG	60 g/L

3. Exactitud

La precisión del ensayo Progensa PCA3 fue evaluada de acuerdo con CLSI EP15-A2 (2005) (7). Los transcritos del ARN de PCA3 y PSA se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-vis, se añadieron a orina femenina normal procesada (con ARN de PCA3 y PSA no detectable) y se midieron las concentraciones en el ensayo Progensa PCA3. El porcentaje (%) de recuperación se calculó como la proporción de C/ml medidos a los s/mL añadidos, multiplicados por 100.

Tabla 9: Recuperación de copias del ensayo Progensa PCA3

Analito	Concentración conocida, c/mL	Concentración medida, c/mL	% de recuperación
PCA3	750	808	108 %
	7.500	7.618	102 %
	18.750	18.722	100 %
	75.000	70.287	94 %
PSA	20.000	23.684	118 %
	250.000	278.373	111 %
	500.000	599.941	120 %
	1.750.000	1.960.775	112 %

4. Linealidad y rango

El rango lineal del ensayo Progensa PCA3 se determinó de acuerdo con CLSI EP6-A (2003) (8) basado en el análisis de regresión lineal (método de los mínimos cuadrados). Se prepararon dos juegos de series de dilución de los especímenes con altas concentraciones del ARN de PCA3 y PSA. Un juego se diluyó en la orina femenina procesada y un juego se diluyó en el diluyente de especímenes. Las diluciones abarcaron el rango del ensayo completo entre los calibradores positivos más bajos y más altos de cada analito. Tanto para los analitos PCA3 como para los PSA, los resultados medidos por el ensayo mostraron una relación de proporción directa entre las pruebas diluidas y la c/mL del analito notificado. No se observó efecto alguno de matriz de diluyente significativo. Consulte Figura 4.

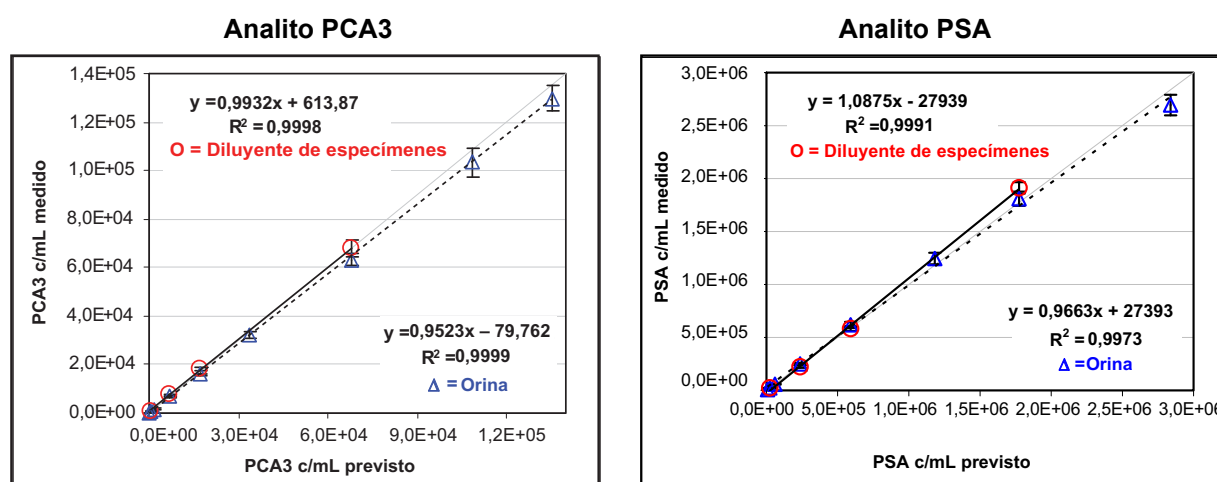


Figura 4. Linealidad del ensayo Progensa PCA3 para los analitos PCA3 y PSA

5. Precisión

La precisión del ensayo Progensa PCA3 fue evaluada de acuerdo con CLSI EP5-A2 (2004) (9). La repetibilidad es precisa en condiciones de variabilidad mínima y la reproducibilidad es precisa en condiciones de variabilidad máxima.

Para la repetibilidad, se preparó un panel de tres miembros compuesto de un transcripto del ARN diluido *in vitro*. Un usuario en un laboratorio analizó el panel de 20 ciclos de 5 replicados durante 20 días, usando un calibrador y un lote de control único, un lote de reactivo y un juego de equipo. En la Tabla 10 se muestra la precisión de la repetibilidad del ensayo Progensa PCA3 en los diferentes niveles de concentración de la prueba.

Tabla 10: Repetibilidad del ensayo Progensa PCA3

Analito	Panel Miembro	Medio c/mL	Repetibilidad DE	Repetibilidad CV
PCA3	1	1.228	145	12 %
	2	12.020	809	7 %
	3	61.108	2.489	4 %
PSA	1	48.091	3.715	8 %
	2	484.457	41.026	8 %
	3	2.001.430	131.554	7 %

Para la reproductividad, se preparó un panel de prueba de ocho miembros compuesto de especímenes agrupados (1 a 3) y un transcripto del ARN diluido *in vitro* (4 a 8). Tres usuarios analizaron el panel en 18 ciclos durante tres días, usando un calibrador y un lote de control único, 3 lotes de reactivos y 3 juegos de equipos. En las Tablas 11 y 12 figura un resumen de la precisión total, intraciclo e interciclo, del usuario, del equipo y del lote del ensayo Progensa PCA3 para el c/mL del analito y el PCA3 Score.

La variabilidad de la intraciclo, interoperador e interciclo fueron, en orden descendiente, los contribuyentes más importantes en la variación general del ensayo. El lote de reactivos y los equipos contribuyeron muy poco en la variación general del ensayo. Los resultados demuestran que el ensayo Progensa PCA3 se comporta de manera reproducible y la fuente principal de la variación se debe a errores aleatorios (intraciclo).

Tabla 11: Reproducibilidad del ensayo Progensa PCA3: Análisis de copias/mL

Analito	Panel Miembro	n	Medido c/mL	CV Total	CV intra-ciclo	CV inter-ciclo	CV, inter-operador	CV, inter-equipo	CV, interlote
PCA3	1	36	248	27 %	24 %	7 %	15 %	11 %	0 %
	2	36	7.021	11 %	6 %	9 %	9 %	0 %	0 %
	3	36	31.469	8 %	6 %	5 %	9 %	0 %	4 %
	4	36	1.469	15 %	13 %	7 %	6 %	0 %	1 %
	5	36	14.844	7 %	5 %	2 %	6 %	0 %	4 %
	6	36	72.372	7 %	4 %	6 %	0 %	1 %	0 %
	7	36	430	26 %	26 %	0 %	11 %	0 %	1 %
	8	36	62.274	13 %	8 %	8 %	3 %	0 %	5 %
PSA	1	34	52.739	9 %	6 %	6 %	7 %	4 %	2 %
	2	34	218.789	10 %	6 %	7 %	7 %	4 %	0 %
	3	32	1.073.920	11 %	4 %	6 %	9 %	8 %	0 %
	4	34	37.185	9 %	5 %	7 %	3 %	0 %	1 %
	5	32	386.504	10 %	4 %	8 %	6 %	3 %	4 %
	6	34	1.518.748	12 %	5 %	8 %	4 %	3 %	7 %
	7	32	11.007	14 %	8 %	9 %	0 %	6 %	0 %
	8	34	1.694.404	11 %	7 %	7 %	0 %	1 %	6 %

Tabla 12: Reproducibilidad del ensayo Progensa PCA3: Análisis del PCA3 Score

Panel Miembro*	n	Puntuación media	CV Total	CV intra-ciclo	CV interciclo	CV, inter-operador	CV, interequipo	CV, interlote
1	34	5	27 %	26 %	5 %	23 %	8 %	0 %
2	34	32	14 %	9 %	10 %	12 %	0 %	2 %
3	32	30	12 %	7 %	5 %	17 %	7 %	6 %
7	32	39	28 %	24 %	2 %	8 %	11 %	7 %
8	34	37	21 %	14 %	12 %	0 %	0 %	9 %

*Los miembros del panel 4 a 6 contenían únicamente el transcritto ARN de PCA3 o PSA y por lo tanto no se incluyen en este análisis.

Bibliografía

1. **Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeny, J.A. Witjes, and J.A. Schalken.** 2003. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. *European Urology.* **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. Aptima PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Chem.* **52**:1089-95.
4. **CLSI.** 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI.** 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI.** 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI.** 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI.** 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.

Hologic, Inc.



10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 EE.UU.

Asistencia al cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Asistencia técnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Para obtener más información, visite www.hologic.com.

EC**REP**

EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, La Haya
Países Bajos

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, y SB100 son marcas comerciales y/o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. y/o de sus subsidiarias en los Estados Unidos y/o en otros países.

eppendorf (estilizado) y REPEATER son marcas comerciales de Eppendorf AG.

RAININ es una marca comercial de Rainin Instrument, LLC.

TECAN y FREEDOM EVO son marcas comerciales de Tecan Group AG.

Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a de sus respectivos propietarios.

©2006 – 2014 Hologic, Inc. Reservados todos los derechos.

501377ES Rev. 001

2014-11